MOFs固定5-羟甲基糠醛氧化酶及其催化活性的研究

巩凤芹[1,2] 刘启顺[2] 谭海东[2] 金 花[3] 谭成玉[1**] 尹 恒[2**]

（1 大连海洋大学海洋科技与环境学院 大连 116023 2 中国科学院大连化学物理研究所天然产物与糖工程组 大连 116023 3 宁波大学材料科学与化学工程学院 宁波 315211）

摘要：固定化酶作为一种绿色高效的生物催化剂，其性能远超游离酶。目前酶的固定化技术适用范围仍然较小，酶的研究范围多停留在模型酶阶段，扩大固定化酶的研究范围具有十分重要的意义。金属有机骨架材料（MOFs）作为酶固定化的载体在近些年得到了广泛的探索，但是具有生物功能的酶-MOFs复合材料的许多特性仍有待挖掘。本文采用仿生矿化的合成方法将5-羟甲基糠醛氧化酶（HMFO）固定到以沸石咪唑酯（ZIF-8）为代表的MOFs材料中，制备得到一种新的生物催化剂HMFO@ZIF-8，扫描电子显微镜表征其形态区别于经典的菱形十二面体。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度，计算得到酶的固定化效率达到89.0%。HMFO@ZIF-8催化5-羟甲基糠醛的转化率达到84.3%，收率和选择性均高于游离酶。本文拓展了MOFs固定化酶的研究范围，为研究其他生物大分子复合材料的生物催化剂提供一定的借鉴意义。

关键词：MOFs；5-羟甲基糠醛氧化酶；固定化酶；生物催化剂

Immobilization of 5-Hydroxymethylfurfural Oxidase within MOFs for Catalysis[1]

GONG Feng-qin[1,2] LIU Qi-shun[2] TAN Hai-dong[2] JIN hua[3] TAN Cheng-yu[1**] YIN Heng[2**]

(1. College of Marine Science and Environment, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, CAS, Dalian 116023, China; 3. College of Material and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China.)

Abstract:

Immobilized enzymes are biocatalysts that typically have higher functional efficiency and reproducibility than free enzymes. However, the use of enzyme immobilization is still limited, and the research is mainly conducted within model enzymes. In recent years, the study of metal organic frameworks (MOFs) as enzyme immobilization carriers has attracted great attention, and the nature of MOF-enzyme complexes remains to be elucidated. In the present study, a novel immobilized biocatalyst was prepared by embedding a 5-hydroxymethylfurfural oxidase (HMFO)

---

* 大连化物所创新基金（DICP ZZBS201704； DICP BioChE-X201801），国家自然科学基金（31670803）

**通讯作者，电子信箱：tanchyu@dlou.edu.cn；yinheng@dicp.ac.cn

in Zeolite Imidazole Ester Skeleton ZIF-8 (a typical MOF) through biomimetic mineralization. The morphology of the composite catalyst under scanning electron microscope was different from the classical rhombohedral dodecahedron of MOF immobilized enzyme. Protein concentration assay conducted by Commassie brilliant blue G-250 method indicated that the immobilization efficiency was reached 89.0%. Moreover, the conversion efficiency of HMFO@ZIF-8 to 5-hydroxymethylfurfural reached 84.3%, and the yield and selectivity were significantly improved as compared to free HMFO. This study provides new knowledge for the research of MOFs immobilized enzymes and facilitates the development of immobilized biomacromolecules and synthetic biocatalysts.

Keywords: MOFs; 5-hydroxymethylfurfural oxidase; immobilized enzyme; biocatalyst

1.引言

生物酶具有独特的高选择性、高催化活性以及条件温和、绿色环保的特点，在化工、制药和食品等领域具有广泛应用[1]。然而，游离酶的稳定性不佳，回收困难，从而限制了其工业应用[2]。为了解决游离酶存在的问题，固定化酶的技术应运而生并不断发展。传统上通过活性炭、金属氧化物、粘土等载体固定酶可以提高其稳定性，但也存在许多问题，包括蛋白固定量小、容易泄露、破坏酶的分子结构、酶的构象发生改变等[3,4]。针对上述问题，基于新型载体材料的固定化技术逐渐得到发展和应用。载体材料由传统材料逐渐发展到以碳纳米管、石墨烯、金属有机骨架以及无机晶体复合材料为代表的新型纳米材料[5]。这类新型载体材料通常具有表面积大、多孔的空间结构、底物/产物亲和性等特征，从而显著提高了酶的固定化效率和稳定性。此外，酶-新型复合材料的固定化技术扩展了其应用范围，除生物催化[6]，还可应用于生物分析[7]和生物医学工程[8]等领域。

在众多的新型载体材料中，金属有机骨架材料（Metal-organic Framework，MOFs）备受关注，其中基于仿生矿化方法合成的沸石咪唑酯骨架材料（Zeolite Imidazole Ester Skeleton， ZIFs）更是成为研究热点。ZIF-8 是由有机和无机成分构成具有笼状结构的材料，具有热稳定性和化学稳定性，其独特的性能使得该材料成功应用于催化[9]、分离[10]、气体吸附[11]等领域。ZIF-8 具有的多孔性可以促进小分子的转运，使得生物大分子（例如酶）与外部环境可以选择性相互作用。此外，ZIF-8 还具有较大的表面积、明确的孔隙率以及丰富的官能团[9,10]，最重要的是，ZIF-8 材料的合成过程十分温和，适用于与生物分子形成复合物，这种生物相容性体现了 ZIF-8 作为载体材料独特的优越性。目前，研究人员对其作为固定化材料进行了广泛的探索，其固定化分子包括 DNA、药物、酶和其他蛋白质[14,15]。ZIF-8 的固定化极大提高了生物大分子的热稳定性、耐有机

溶剂性能和储存时间[16]。

目前关于新型材料固定化酶的研究，尤其是 ZIF-8 固定化酶的研究主要集中在较多的模型酶，包括葡糖糖氧化酶[11]、辣根过氧化物酶[12]、脂肪酶[13]等，酶的研究类型及范围相对较窄。由于固定化载体的选择需要综合考虑目标酶的分子大小，氨基酸组成，结构特点及理化性质，所以至今没有针对某一类酶通用的固定化方法，仍缺乏更广泛的结构性质及机理的研究。因此，扩大新型材料固定化酶的研究范围，对酶-新型材料复合结构的基础和应用研究具有十分重要的意义。2015 年，Jin 等[14]通过制备一系列的 MOFs 实现了在混合溶液中高效的吸附分离 5-羟甲基糠醛（5-hydroxymethylfurfural，HMF），比较了 ZIF-8，ZIF-90 及 ZIF-93 对 HMF 的特异性吸附效果，结果表明 ZIF-8 的吸附量最高。而 5-羟甲基糠醛氧化酶（5-hydroxymethylfurfural oxidase，HMFO）作为一种葡萄糖-甲醇-胆碱氧化氧化酶 [15]，可以有效的催化 HMF 生成一系列高附加值化合物。鉴于 ZIF-8 特异性吸附 HMF 的特点，通过 ZIF-8 固定 HMFO，理论上能够提高 HMFO@ZIF-8 对 HMF 的催化效果。HMFO 在辅因子存在下，经过连续催化反应后，可生成产物 2,5-呋喃二甲酸（2,5-Furandicarboxylic acid , FDCA），而没有辅因子时，主要生成 2,5-二甲酰呋喃（2,5-Furandicarboxaldehyde，DFF）和 5-羟甲基-2-呋喃甲酸（5-hydroxymethyl-furan-2-carboxylic acid， FFA）。由于文献报道[14]合成 ZIF-8 的方法中含有有机溶剂，容易造成酶的失活，故本研究采用仿生矿化的合成方法在水溶液中制备 ZIF-8，首次以 ZIF-8 为基质对 HMFO 实现了固定化，制备得到 HMFO@ZIF-8 的复合材料，同时考察了 ZIF-8 合成原料对 HMFO 活性的影响。本文拓展了 ZIF-8 固定化酶的研究范围，为理解仿生矿化固定酶分子提供了借鉴意义。

2.实验部分

2.1 仪器与试剂

5-羟甲基糠醛氧化酶（分子量约 60KDa）来源于硝基还原假单胞菌（Pseudomonas nitroreducens CICC 20703），购于中国工业微生物菌种保藏管理中心，中科院大连化学物理研究所 1805 组保藏；

乙酸锌（天津市大茂化学试剂厂），2-甲基咪唑（西格玛奥德里奇贸易有限公司），以及其他未说明的试剂均为分析纯。

HMF（西格玛奥德里奇贸易有限公司），DFF（北京伊诺凯科技有限公司），FFA（北京百灵威科技有限公司）均为色谱纯。

ML104 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)；Fresco21 型微量冷冻型离心机（北京诚茂兴业科技有限公司）；BioTek 酶标仪（BioTek Instruments, Inc）；NULL 高效液相色谱系统（大连

依利特分析仪器有限公司)；JEOL SEM JSM-7800F 型扫描电子显微镜（日本电子株式会社)；FV1000MPE 激光共聚焦显微镜（日本奥林巴斯)。

2.2 实验方法

2.2.1 HMFO@ZIF-8 的合成、蛋白浓度以及负载率的测定

ZIF-8 是由二价金属盐和咪唑或其衍生物配体在室温下反应生成的一类具有沸石咪唑骨架结构的 MOFs 材料[16]。在合成 ZIF-8 的过程中加入 HMFO 一锅法合成 HMFO@ZIF-8。取 2.0 mL 2-甲基咪唑（160.0 mM）溶液，加入 0.5 mL HMFO (1.0 mg/mL) 溶液，混合均匀后加入 2.0 mL 乙酸锌（40.0 mM）溶液，搅拌静置过夜，所得固体用去离子水洗涤 3 次，得到 HMFO@ZIF-8。

收集所有上清液，以牛血清蛋白（Albumin from bovine serum，BSA）作为标准品，采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白浓度并计算 HMFO 的负载率。

配制 0-0.1mg/mL 的 BSA 溶液，分别取 50 μL 的样品蛋白和各浓度下的 BSA 于 96 孔板中，各加入 200 μL 的考马斯亮蓝染液，反应 3min 后测定 595 nm 下的吸光值，根据 BSA 的标准曲线计算蛋白质浓度，并利用公式（1）计算 HMFO 的负载率。

$$\text{HMFO负载率}(\%)=\frac{(A\text{-}B)}{A}\times 100\% \qquad (1)$$

其中：A 为加入的蛋白含量/mg，B 为上清液中的蛋白含量/mg。

2.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）表征 HMFO@ZIF-8

将 HMFO@ZIF-8 加入适量冰醋酸溶解，按照体积比 4:1 比例加入体积比为 1:1 的乙醇和丙酮混合溶液，于-20℃放置 2h 后离心，弃上清，用无水乙醇将沉淀洗涤三次，加入 2.0% SDS 超声溶解，取 40 μL 蛋白溶液和 10 μL 样品缓冲液(5×)混匀，煮沸 10min，取上清进行 SDS-PAGE 测定。另外分别取 40 μL 负载上清液和 HMFO 同时进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2.2.3 激光共聚焦显微镜表征 HMFO@ZIF-8

取 1.0 mL HMFO（1.0 mg/mL）溶解在 10.0 mL PBS 缓冲溶液中（20.0 mM，pH 7.9)，加入 3.0 mg 异硫氰酸荧光素（Fluorescein isothiocyanate isomer，FITC)，室温搅拌反应 24 h。透析 3 天，冻干，在避光条件下按照 2.2.1 的合成方法制备 FITC-HMFO@ZIF-8 颗粒。采用激光共聚焦显微镜对制备好的样品进行荧光检测，FITC 绿色荧光通道，激发波长为 488nm,发射波长为 500-550nm。

2.2.4 扫描电子显微镜表征 HMFO@ZIF-8

将制备的 HMFO@ZIF-8 进行冷冻干燥，取少量样品置于扫描电子显微镜内进行形貌表征。扫描电压 1.0KV，工作距离 8.0mm，放大倍数 5000-10000。

2.2.5 酶活性测定

HMFO 作为黄素依赖性氧化酶，可将芳香族的香草醇氧化为香草醛，在 320 nm 下具有强烈的紫外吸收[17]。取 50μL HMFO 溶液（3.0 mg/mL）加入 1.0 mg/mL 香草醇的磷酸钾缓冲溶液中（50.0 mM，pH 8.0），于 25℃的震荡孵育器中反应 1h，反应完成后，12000 rpm 离心 10 min (未经负载的游离酶液煮沸 10 min 后再离心)，于 320 nm 下测定 OD 值，计算酶活。按照每分钟催化 1μmol 的底物所生成的产物的量为一个酶活单位 U。

2.2.6 HMFO@ZIF-8 催化氧化 HMF

在催化体系中，考察了水和磷酸钠缓冲溶液（20.0 mM, pH 7.9）两种反应体系的 HMFO@ZIF-8 复合材料的催化性能。分别取 0.5 mg/mL 的 HMF 溶液，将 4.0 mL 体系制备的 HMFO@ZIF-8 的量一次性加入反应中，将充满空气的气球连接到圆底烧瓶中，为确保氧气充足，每隔 12h 重新将气球充满空气，反应过程气球保持鼓胀状态，30℃下磁力搅拌反应 85h，同时以游离 HMFO 作为对照。反应完成后，加入适量盐酸将 HMFO@ZIF-8 溶解，12000 rpm 离心 10 min，经 0.22μm 的水系滤膜过滤，采用高效液相色谱进行产物分析。通过公式（2）计算 HMF 的转化率，公式（3）计算 DFF 及 FFA 的收率。

$$\text{转化率}(\%)=\frac{(\text{初始反应物浓度-剩余反应物浓度})}{\text{初始反应物浓度}}\times 100\% \qquad (2)$$

$$\text{收率}(\%)=\frac{\text{生成的目标产物的浓度}}{\text{初始反应物浓度}}\times 100\% \qquad (3)$$

色谱分析条件：分析柱为 Hi-PlexH 柱（300mm×7.7mm，安捷伦）；柱温 60℃；检测器为 UV-230 紫外可见光检测器；流动相为 5mM 硫酸溶液，流速为 0.7 mL/min；检测波长为 268 nm。

3.结果与讨论

3.1 HMFO@ZIF-8 合成、负载量的测定

酶的固定化要基于目标酶的性质，考察固定化方法、酶固定化率、酶活性和稳定性等因素。本文采用仿生矿化的合成方法首次制备了非模型酶的 HMFO@ZIF-8 复合材料，HMFO@ZIF-8 的负载量达到 89%（图 1），远远高于传统载体的固定化效率，邢丹等人[18]以海藻酸钙为载体固定毕赤酵母菌表达的 CotA 漆酶，固定化效率为 32.2%。Cherian 等[19]利用 MnO_2 纳米粒子固定纤维素酶的最大固定化效率也仅为 75%。这种简单温和的合成方法，不仅具有高效的蛋白封装效率，而且避免了氧化石墨烯、碳纳米管等材料合成周期长，过程繁琐的缺点。同二维材料氧化石墨烯相比，基于三维材料 MOFs 为载体的酶固定化方法，可以为蛋白质分子量身打造适合的孔径大小，提高酶与底物的结合效率，阻止其他大分子物质对目标蛋白造成的降解。

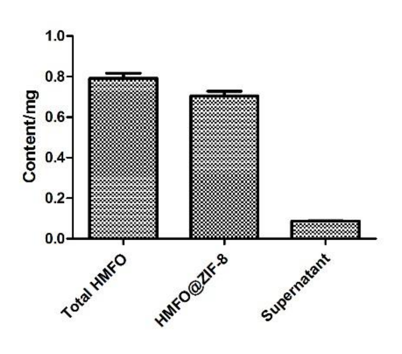


图 1 HMFO@ZIF-8 的负载量

Fig 1 The HMFO loading in ZIF-8

3.2 SDS-PAGE 电泳表征 HMFO@ZIF-8

为了避免加入的冰醋酸对 SDS-PAGE 电泳造成影响，采用有机溶剂沉淀蛋白除去多余的有机配体、金属离子以及冰醋酸溶液，对合成的 HMFO@ZIF-8 粉末和上清液进行了同等条件的处理。SDS-PAGE 结果发现 HMFO@ZIF-8 粉末中有蛋白条带，而负载的上清液中则没有条带（图 2），这表明溶液中 HMFO 基本负载到 ZIF-8 中，与上述的结果相符。

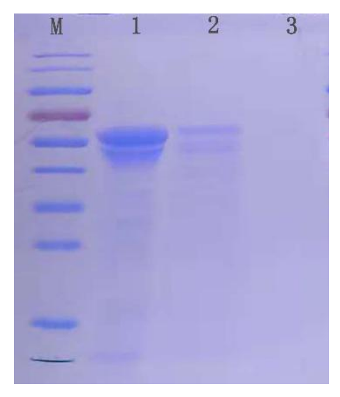


图 2 HMFO 和 HMFO@ZIF-8 的 SDS-PAGE 蛋白电泳分析图

Fig 2 SDS-PAGE analysis of HMFO and HMFO@ZIF-8

M 是标准蛋白分子，条带 1 是 HMFO，条带 2 是 HMFO@ZIF-8 粉末，条带 3 是制备过程中上清液

M: Western blot marker; 1: Free HMFO; 2: HMFO@ZIF-8; 3: The supernatant of HMFO@ZIF-8

3.3 激光共聚焦显微镜表征 HMFO@ZIF-8

以 FITC 为荧光探针，对 HMFO 进行标记，制备 HMFO-FITC@ZIF-8，在激光共聚焦显微镜下进行观察，可以看到分布均匀的荧光斑点(图 3)。由于 2-甲基咪唑和乙酸锌均不发荧光，故荧光信号应来自于被 FITC 标记的 HMFO，进一步表明 HMFO 已经负载到 ZIF-8 中。

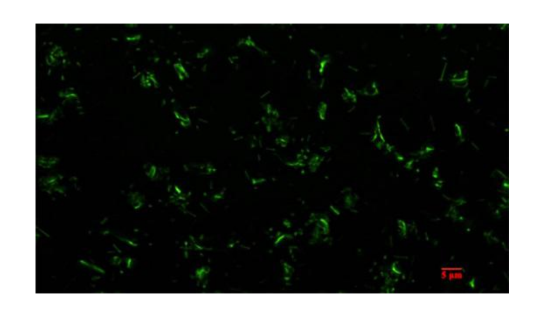


图 3 FITC-HMFO@ZIF-8 激光共聚焦显微镜图

Fig 3 Confocal microscopy image of the FITC-HMFO@ZIF-8

3.4 扫描电子显微镜表征 HMFO@ZIF-8

将 HMFO@ZIF-8 样品进行冻干处理，经扫描电子显微镜观察其形态特征。结果发现通过该方法制备合成的 HMFO@ZIF-8 并非经典的菱形十二面体结构，而是一种纳米花结构（图 4a），推测可能是蛋白质的引入改变了 ZIF-8 的结晶过程。更有研究表明，酶@ZIF-8 复合材料的形态会根据蛋白分子的不同呈现出不同的形态，在同样条件下对 BSA 进行封装，表征结果为经典的菱形十二面体结构，而用同样的方法对卵清蛋白、核糖核酸酶、葡萄糖脱氢酶、脂肪酶、溶菌酶、胰岛素、辣根过氧化物酶、胰蛋白酶、脲酶等进行了一系列的封装，则呈现出了不同的形貌[20]。为了验证上述观点，同时制备了 BSA@ZIF-8，得到经典的菱形十二面体结构（图 4b），从而进一步证实了上述推测。

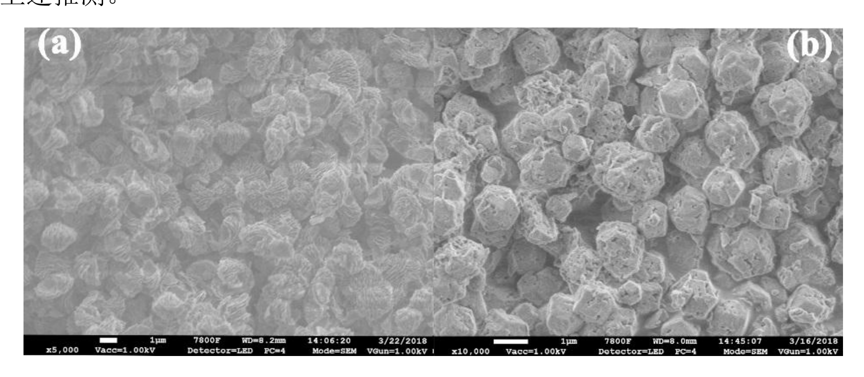


图 4 HMFO@ZIF-8(a)、BSA@ZIF-8(b)的扫描电镜图

Figure 4 SEM images of the HMFO@ZIF-8 (a) and BSA@ZIF-8 (b)

3.5 HMFO@ZIF-8 催化转化 5-羟甲基糠醛

以香草醇为底物测定酶的活性，固定化后的酶保留了原来 20%的活性。考察了不同浓度的 2-甲基咪唑、乙酸锌的浓度对 HMFO 活性的影响，结果发现 2-甲基咪唑（图 5）、乙酸锌（图 6）在不同程度上会降低 HMFO 的活性，这可能是负载后的 HMFO 存在一定失活现象的原因。

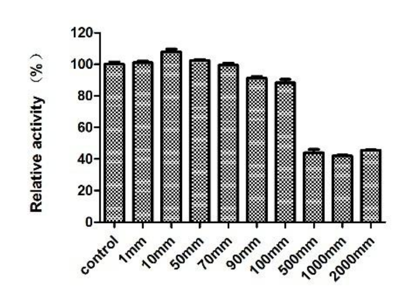


图 5 不同浓度的 2-甲基咪唑对 HMFO 酶活的影响

Fig 5 Effects of different concentrations of 2-methylimidazole on HMFO activity

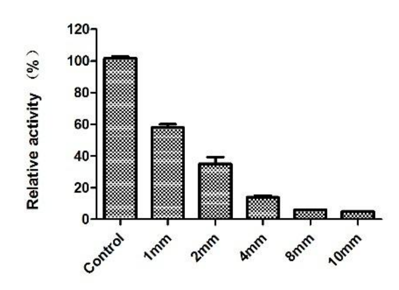


图 6 不同浓度的乙酸锌对 HMFO 酶活的影响

Fig 6 Effects of different concentrations of zinc acetate on HMFO activity

尽管目前已经报道了大量的固定化材料，目前还没有一种材料能够适用于所有的酶的固定化。溶液 pH、金属离子和温度对酶活性均具有影响。不同浓度的锌离子对 HMFO 的酶活性会造成不同程度的抑制，且随着锌离子浓度的升高抑制程度增强。另一方面，2-甲基咪唑溶液呈强碱性，当浓度大于 0.1M 时，HMFO 的活性仅剩 40%左右。这可能是由于酶分子的结构发生变化导致分子内和分子间的键的裂解以及亚基的解离[21]。这些结果对后续 ZIF-8 固定化酶的研究具有借鉴意义。

HMF 是一种重要的生物基平台化合物[22]，HMF 含有呋喃环、醛基和羟甲基基团，HMFO 选择性氧化 HMF 可以产生 C6 大宗化学品，包括 DFF、FFA 和 FDCA，可用于医药、塑料、燃料等领域[23-25]。HMFO 在无辅因子的情况下可将 HMF 转化生成 DFF 和 FFA。HMFO@ZIF-8 在不同反应体系中催化 HMF，反应 85h 后用高效液相色谱检测反应物和产物，如图 7 所示。通过制备一系列不同浓度的标准品化合物，根据峰面积与浓度的对应关系进行线性拟合，以色谱峰面积作为纵坐标，各个物质的浓度作为横坐标，得到 HMF、DFF、FFA 的标准曲线，如图 8 所示，从而计算各化合物反应前后的浓度。计算得到 HMF 转化率 84.3%，DFF 收率 64.1%，FFA 收率 17.7%，两者合并收率达 81.8%，选择性达 97%；收率和选择性均高于游离酶的 71.7%（表 1）。当以香草醇作底物时 HMFO@ZIF-8 的酶活性低于游离酶，但是其催化氧化 HMF 时的选择性和收率更好。虽然引入 HMFO 后合成的 ZIF-8 与原来报道的 ZIF-8[14]结构不同，但其存在的多孔性

仍然对 HMF 具有一定的吸附作用，这在一定程度上提高了固定化酶与 HMF 的结合速度，从而加快了 HMF 的催化效率。

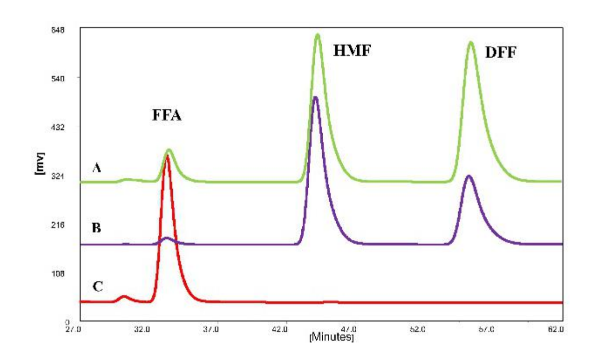


图 7 HMFO 和 HMFO@ZIF-8 催化 HMF 后的色谱图

Figure 7 The conversion chromatogram of HMF by HMFO 和 HMFO@ZIF-8

注：A 为 HMFO@ZIF-8，20mM PBS 缓冲溶液体系；B 为 HMFO@ZIF-8，水溶液反应体系；C 为游离的 HMFO，20mM PBS 缓冲溶液体系

A: HMFO@ZIF-8,20 mM PBS buffer solution; B: HMFO@ZIF-8, aqueous solution; C: free HMFO, 20 mM PBS buffer solution

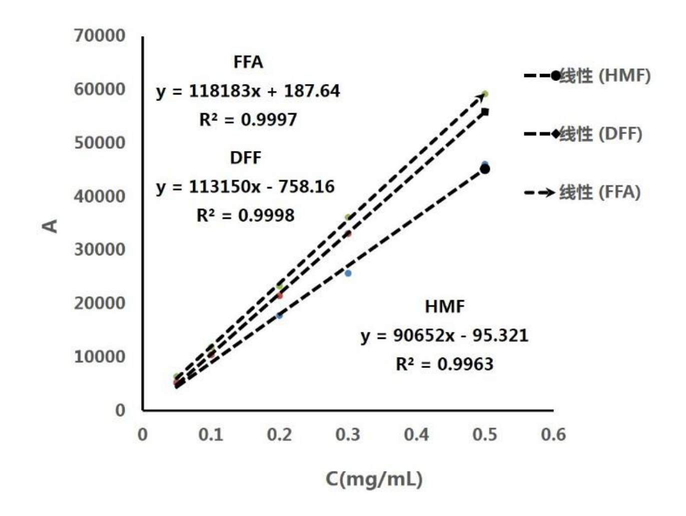


图 8 HMF、DFF、FFA 的标准曲线

Figure 7 Standard curve drawing of each compound

表 1 HMFO@ZIF-8 催化 HMF 的转化率

Table 1 The conversion rate of HMF by HMFO@ZIF-8

Enzyme	Time(h)	HMF conversion (%)	DFF yield (%)	FFA yield (%)
A	85.0	84.3	64.1	17.7
B	85.0	33.8	32.3	1.5

C	85.0	100.0	0.0	71.7

注：A 为 HMFO@ZIF-8，20mM PBS 缓冲溶液体系；B 为 HMFO@ZIF-8，水溶液反应体系；C 为游离的 HMFO，20mM PBS 缓冲溶液体系

3.结论

本文在温和、简单有效的条件下，采用仿生矿化的合成方法首次对非模型酶 HMFO 进行固定化，成功的得到具有催化活性的 HMFO@ZIF-8，酶负载量达到 89.0%。对 HMFO@ZIF-8 的形态表征发现其结构区别于经典的菱形十二面体结构，为纳米花结构。酶活检测发现负载后的 HMFO@ZIF-8 保留了原来的 20%的活性，其失活可能是由 2-甲基咪唑的强碱性和高浓度的乙酸锌对 HMFO 结构的影响造成的。由于 ZIF-8 对 HMF 的特异性吸附作用，HMFO@ZIF-8 催化转化 HMF 时，HMF 转化率达 84.3%，DFF 和 FFA 合并收率达 81.8%，选择性达 97%，收率和选择性均高于游离酶的 71.7%。本文的研究表明采用生物矿化策略固定生物大分子，要充分考虑目标酶的结构性质与固定化载体之间的相互关系，从而达到酶性能的最大化利用。本文的研究结果为拓展和理解酶@ZIF-8 复合材料的基础和应用提供了借鉴意义。

参考文献

[1] Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, et al. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents[J]. ACS Catalysis, 2013, 3(12): 2823-2836.

[2] Cantone S, Ferrario V, Corici L, et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods[J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(15): 6262-6276.

[3] Ke C, Fan Y, Su F, et al. Recent advances in enzyme immobilization[J]. Chinese journal of biotechnology, 2018, 34(2): 188-203.

[4] Majewski M B, Howarth A J, Li P, et al. Enzyme encapsulation in metal-organic frameworks for applications in catalysis[J]. Crystengcomm, 2017, 19(29): 4082-4091.

[5] 李梦腊, 毛洪丽, 黄志强. 智能固定化酶载体的研究进展[J]. 工业微生物, 2018, 48(03): 46-54.

[6] Kahn J S, Freage L, Enkin N, et al. Stimuli-Responsive DNA-Functionalized Metal-Organic Frameworks (MOFs)[J]. Adv Mater, 2017, 29(6).

[7] Zhuang J, Kuo C-H, Chou L-Y, et al. Optimized Metal–Organic-Framework Nanospheres for Drug Delivery Evaluation of Small Molecule Encapsulation[J]. ACSNano, 2014, 08(03): 2812-2819.

[8] Patricia Horcajada R G, Tarek Baati. Metal–organic frameworks in biomedicine[J]. Chem. Rev., 2012.

[9] Meek S T, Greathouse J A, Allendorf M D. Metal-organic frameworks: a rapidly growing class of versatile nanoporous materials[J]. Adv Mater, 2011, 23(2): 249-267.

[10] Wang X, Makal T A, Zhou H-C. Protein Immobilization in Metal-Organic Frameworks by Covalent Binding[J]. Australian Journal of Chemistry, 2014, 67(11): 1629-1631.

[11] Vranish J N, Ancona M G, Oh E, et al. Enhancing coupled enzymatic activity by conjugating one enzyme to a nanoparticle[J]. Nanoscale, 2017, 9(16): 5172-5187.

[12] 田运奇, 吴小芳, 侯文颖. 辣根过氧化物酶在 MOF 上的固定化研究[J]. 辽宁师范大学学报（ 自然科学版）, 2016, 39(03): 373-376.

[13] Wu X, Yang C, Ge J. Green synthesis of enzyme/metal-organic framework composites with high stability in protein denaturing solvents[J]. Bioresources and bioprocessing, 2017, 4(1): 24-24.

[14] Jin H, Li Y, Liu X, et al. Recovery of HMF from aqueous solution by zeolitic imidazolate frameworks[J]. Chemical Engineering Science, 2015, 124: 170-178.

[15] Dijkman W P, Fraaije M W. Discovery and Characterization of a 5-Hydroxymethylfurfural Oxidase from Methylovorus sp. Strain MP688[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 1082-1090.

[16] 陈英波, 赵林飞, 彪王. 沸石咪唑骨架材料(ZIF-8)的结构生长过程[J]. 天津工业大学学报, 2016, 35(05):1-4.

[17] Dijkman W P, Binda C, Fraaije M W, et al. Structure-Based Enzyme Tailoring of 5-Hydroxymethylfurfural Oxidase[J]. ACS Catalysis, 2015, 5(3): 1833-1839.

[18] 邢丹,马铭鸿,吴航伸. CotA 漆酶的固定化及其对溴麝香草酚蓝脱色的效果[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(10):40-43+48.

[19] Cherian E, Dharmendirakumar M, Baskar G. Immobilization of cellulase onto MnO2 nanoparticles for bioethanol production by enhanced hydrolysis of agricultural waste[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2015, 36(8): 1223-1229.

[20] Liang K, Ricco R, Doherty C M, et al. Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules[J]. Nature Communications, 2015, 6.

[21] Hu Y, Dai L, Liu D, et al. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/MOFs)[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018, 91: 793-801.

[22] Chheda J N, Huber G W, Dumesic J A. Liquid-phase catalytic processing of biomass-derived oxygenated hydrocarbons to fuels and chemicals[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46(38): 7164-7183.

[23] 王军, 张春鹏, 欧阳平凯. 5-羟甲基糠醛制备及应用的研究进展[J]. 化工进展, 2008, 27(05): 702-707.

[24] 郑路凡，杜泽学，宗保宁. 催化合成典型 5-羟甲基糠醛衍生物的研究进展[J]. 化工进展, 2015, 34(06): 1511-1518.

[25] Dijkman W P, Groothuis D E, Fraaije M W. Enzyme-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural to furan-2,5-dicarboxylic acid[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2014, 53(25): 6515-6518.